

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12542

研究課題名(和文)重症心不全に対する遺伝子治療をめざした抗体核酸複合体の開発

研究課題名(英文)Development of a novel antibody gene complex for the gene therapy of heart failure.

研究代表者

松崎 高志 (MATSUZAKI, Takashi)

大阪大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：90456939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：重症心不全に対する安全で高効率な遺伝子治療を可能にするため、不全心で発現上昇するHB-EGFに対する抗体を用いた抗体核酸複合体を開発した。インフルエンザヘマグルチニン由来pH依存的膜融合ペプチドと、エンドソーム局在プロテアーゼカテプシンの認識ジペプチドから成るポリペプチドをリンカーとしてsiRNAを抗体に付加することで、標的細胞内へデリバリーされたsiRNAが高率にエンドソームからエスケープし、高い遺伝子ノックダウン効率を示すことが明らかとなった。また、不全心におけるHB-EGF抗体薬物複合体の標的細胞が、線維芽細胞である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To realize the safety and efficiently gene therapy for severe heart failure (HF), we developed a novel antibody gene conjugate using antibody to the extracellular domain of HB-EGF, which had been reported to be upregulated in HF. Using polypeptide linker composed of pH-dependent fusogenic peptide of influenza hemagglutinin 2 (HA2) and dipeptide of endosomal protease cathepsin recognition site, we successfully developed an anti-HB-EGF antibody-siRNA conjugate that showed efficient endosome escape capability and elevated knockdown efficiency in vitro. In addition, immunofluorescent microscopy and flow cytometry analysis suggested that cardiac fibroblasts are potential targets for gene therapy in HF with anti-HB-EGF antibody-siRNA conjugate.

研究分野：DDS、循環器内科、抗体薬物複合体、遺伝子治療

キーワード：抗体薬物複合体 遺伝子治療 siRNA 心不全

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症心不全はガンと並ぶ予後不良の疾患で、治療法の開発は重要なアンメットメディカルニーズとなっている。近年、アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた重症心不全患者への遺伝子導入臨床試験、および不全心モデル動物への shRNA・miRNA 導入実験により、心不全への遺伝子治療の有効性が示唆された (Greenberg B et al. *JACC Heart Fail.* 2014、Wahlquist C et al. *Nature* 2014、Miyazaki Y et al. *PLoS ONE* 2012)。しかしながら、AAV は抗原性が高く、肝機能障害等の重篤な副作用を引き起こすことが報告されており (Mingozzi F et al. *Blood.* 2013)、非ウイルスベクターによる不全心特異的核酸デリバリーシステムの開発が急務となっている。

2. 研究の目的

近年、疾患部位特異的に発現上昇する分子を標的とする抗体を用いた「抗体薬物複合体」が注目されている。これは、細胞膜上の標的分子に結合後、エンドサイトーシス等により細胞内部に取り込まれる“細胞内侵入抗体”を用い、薬剤・核酸 (siRNA や miRNA 等) を効率よく標的細胞内へ送達し、薬効の増加と副作用の軽減を実現する新しい創薬概念である。申請者らは、マウスおよびヒト不全心臓において発現が増大する細胞膜上分子 (HB-EGF) を見出し、特許を取得した抗ヒト HB-EGF 抗体を用いた抗体核酸複合体を開発し、不全心への核酸送達に成功している。本研究では、臨床に向け複合体構造を最適化し、不全心での標的細胞・遺伝子を同定することで、重症心不全に対する革新的遺伝子治療薬の創製を目指す。

3. 研究の方法

1) HB-EGF 抗体核酸複合体の最適化

臨床応用の際に抗原性が問題となるアビジンを利用することなく核酸を抗体に付加するため、二価性架橋剤 (ヘテロクロスリンカー) を用い、核酸の抗体への直接付加法を検討する。また、標的細胞内で siRNA のリリースとエンドソーム脱出を促進し、標的遺伝子のノックダウン効率を向上させるため、siRNA と HB-EGF 抗体を繋ぐリンカー部位に、エンドソーム局在システインプロテアーゼ (カテプシン) 認識ペプチドとインフルエンザヘマグルチニン 2 (HA2) 由来 pH 依存性膜融合ペプチドを融合し挿入する。細胞内での siRNA の (抗体からの) リリース効率は、およびのセンス鎖 5' 末端をスクシイミド基またはアミノ基で修飾し、ペプチド-p-ニトロフェニルカーバメート基や二価架橋剤を利用し、HB-EGF 抗体核酸複合体を作成する。作成した HB-EGF 抗体核酸複合体について以下の項目について検討する。1) HB-EGF への結合能の評価: 表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) 等により結合乖離定数を求める。2) 細胞内局在およびエンド

ソーム脱出能等を共焦点レーザー顕微鏡を用いて in vitro で評価する。3) HB-EGF 安定発現細胞を用い、in vitro で核酸送達能を評価する。4) 血中安定性を in vitro で評価し、血中での非特異的核酸分解およびリリースを最適化する。5) 不全心モデルヒト型 HB-EGF ノックインマウスを用い、レポーター遺伝子を標的とした in vivo 核酸送達能を評価する。

2) HB-EGF 抗体核酸複合体の標的細胞の同定

蛍光標識 HB-EGF 抗体核酸複合体をヒト型 HB-EGF ノックインマウスの不全心モデルに静脈内投与後、心筋組織をホモジナイズし、FACS を用いて HB-EGF 抗体核酸複合体由来の蛍光示す細胞を分取する。分取した細胞より mRNA を抽出し、心筋細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞、マクロファージの各マーカー分子の発現を定量的 PCR 法により解析し、HB-EGF 抗体核酸複合体の標的細胞の同定を行う。

3) 心不全原因遺伝子を標的とした核酸デリバリー

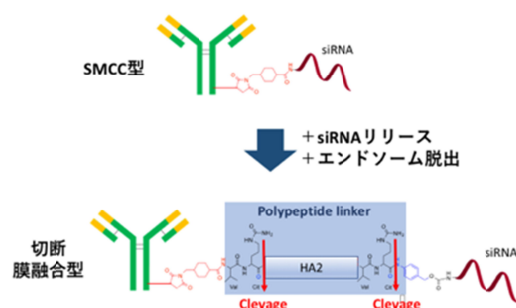
同定した細胞で心不全関連遺伝子として報告されている遺伝子 (心筋細胞の場合 Phospholamban または miR-25、内皮細胞の場合 Endothelin-1、線維芽細胞の場合 Hsp47 など) に対する siRNA またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた抗体核酸複合体を作製する。心不全モデルに静脈内投与後、不全心での標的遺伝子のノックダウン効率を定量的 PCR 法およびウエスタンブロット法で検討する。ノックダウン効率の高いものについては、治療効果を超音波エコーによる心機能評価および組織学的な解析により評価する。

4. 研究成果

1) HB-EGF 抗体核酸複合体の最適化

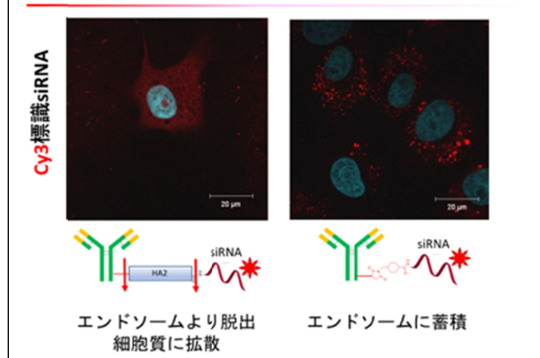
センス鎖 5' 末端をアミノ修飾した siRNA に、2-Iminothiolane を用いてスクシイミド基 (SH 基) を付加した。HB-EGF 抗体のアミノ基に二価架橋剤 (sulfo-SMCC) を介して SH 修飾 siRNA を直接結合させることで、アビジンを利用しない HB-EGF 抗体核酸複合体の作成に成功した (図 1 上)。

図1. HB-EGF抗体核酸複合体の最適化



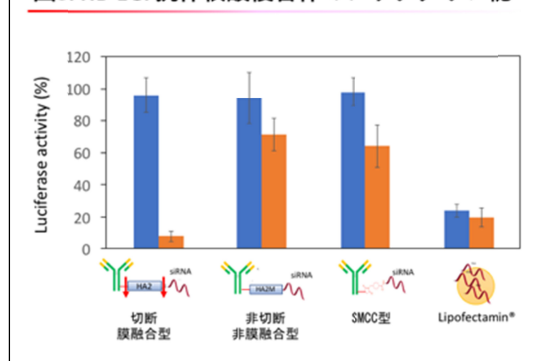
本ベクターは、in vitroでHB-EGF発現細胞特異的にsiRNAをデリバリーし標的遺伝子をノックダウンしたが、デリバリーされたsiRNAの大部分は細胞内エンドソームに蓄積し脱出していなかった(図2右)。

図2. HB-EGF抗体核酸複合体の細胞内局在



この問題を解決するため、エンドソームプロテアーゼ・カテプシンの基質ジペプチド(Val-Cit)、およびインフルエンザヘマグルチニン2(HA2)pH依存的膜融合ペプチドからなるポリペプチドリンカーを用いたHB-EGF抗体核酸複合体を作成した。ペプチドリンカーとsiRNAの結合は、アジドとアルキンの付加環化反応を利用したクリックケミストリーを用い、HB-EGF抗体とペプチドリンカーの結合には、二価架橋剤(Sulfo-SMCC)を用いた(図1下)。細胞内におけるリンカー切断効率を検証した結果、細胞内へ送達されたsiRNAの約50%が切断されることが明らかとなった。また、共焦点レーザー顕微鏡による解析から、エンドソームへのsiRNAの蓄積が軽減し、細胞質へ脱出していることが明らかとなった(図2左)。更に、陰性コントロールの非切断型および低膜融合型のHB-EGF抗体核酸複合体と比較し、有意に高い遺伝子ノックダウン効率を示すことも明らかとなった

図3. HB-EGF抗体核酸複合体のノックダウン能



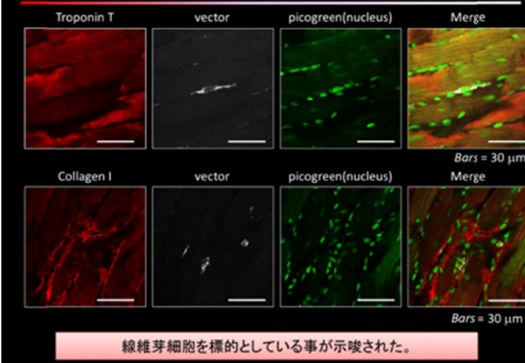
(図3)。

以上の結果から、アビジン/ビオチン結合を介さず、二価架橋剤とポリペプチドリンカーを用い、細胞質へ高効率にsiRNAをデリバリー可能な画期的なHB-EGF抗体核酸複合体の開発に成功した。

2) HB-EGF抗体核酸複合体の標的細胞の同定

HB-EGF抗体核酸複合体の不全心での標的細胞を同定するため、心不全モデルマウスに蛍光標識HB-EGF抗体核酸複合体を静脈内投与後、近赤外共焦点レーザー顕微鏡を用いて心筋組織の組織学的解析を行った。その結果、HB-EGF抗体核酸複合体は心筋細胞マーカーであるトロポニンTと共染色されず、繊維芽細胞マーカーであるI型コラーゲンと一部共染色することが明らかとな

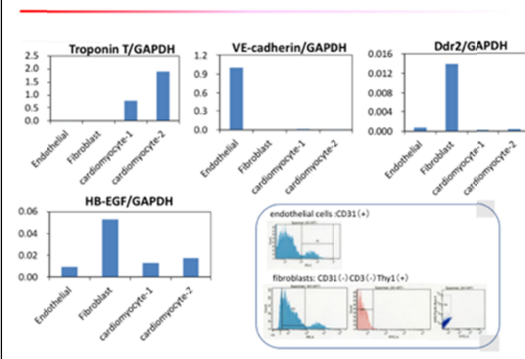
図4. HB-EGF抗体核酸複合体の不全心における標的細胞



った。

次に、不全心の繊維芽細胞がHB-EGFを発現しているのかについて検討した。ランゲンドルフを用いたコラゲナーゼ灌流法により不全心の心筋組織を分散処理後、セルソーター(FACS)を用いて繊維芽細胞[CD31(-), CD3(-), Thy1(+)]、血管内皮細胞[CD31(+)]、および心筋細胞[CD31(-), CD3(-), Thy1(-)]をソーティングにより分取した。分取した各細胞の純度を定量的PCRにより評価を行ったところ、繊維芽細胞[マーカー遺伝子: Discoidin domain receptor 2(DDR2)]の心筋細胞および血管内皮細胞へのコンタミは、約3%以下で極めて高純度に分離可能であることが明らかとなった。次に、各細胞群中のHB-EGFのmRNA発現量を定量的PCRにより測定した。その結果、繊維芽細胞ではHB-EGFが高発現していることが明らかとなった。一方、血管内皮細胞や心筋細胞ではHB-EGFの発現が低いこ

図5. 不全心からの繊維芽細胞の単離とHB-EGFの発現



とが明らかとなった。

以上の結果から、HB-EGF 抗体核酸複合体の不全心における標的細胞は、繊維芽細胞である可能性が示唆された。

3) 心不全原因遺伝子を標的とした核酸デリバリー

HB-EGF 抗体核酸複合体の標的細胞が、繊維芽細胞であることが示唆されたことから、不全心の線維芽細胞における発現亢進と病態との関係が指摘されているコラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 に対する siRNA を用い、HB-EGF 抗体核酸複合体を作成した。In vitro でのノックダウン効果を、マウス培養線維芽細胞を用いて評価した結果、高いノックダウン効率を示すことが明らかとなっている。現在、マウス心不全モデルを用いた in vivo ノックダウン評価を行うための準備を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Fu HY, Sanada S, Matsuzaki T, Liao Y, Okuda K, Yamato M, Tsuchida S, Araki R, Asano Y, Asanuma H, Asakura M, French BA, Sakata Y, Kitakaze M, Minamino T.
Chemical Endoplasmic Reticulum Chaperone Alleviates Doxorubicin-Induced Cardiac Dysfunction.
Circulation Research, 2016, 118, 798-809

Okuda K, Fu HY, Matsuzaki T, Araki R, Tsuchida S, Thanikachalam PV, Fukuta T, Asai T, Yamato M, Sanada S, Asanuma H, Asano Y, Asakura M, Hanawa H, Hao H, Oku N, Takashima S, Kitakaze M, Sakata Y, Minamino T.
Targeted Therapy for Acute Autoimmune Myocarditis with Nano-Sized Liposomal FK506 in Rats.
PLoS One, 2016, 11

Araki R, Matsuzaki T, Nakamura A, Nakatani D, Sanada S, Fu HY, Okuda K, Yamato M, Tsuchida S, Sakata Y, Minamino T.
Development of a novel one-step production system for injectable liposomes under GMP.
Pharmaceutical Development and Technology, 2017, 1-6

Masaki Yamato, Takashi Matsuzaki, Ryo Araki, Shota Tsuchida, Keiji

Okuda, Hai Ying Fu, Shoji Sanada, Hiroshi Asanuma, Yoshihiro Asano, Masanori Asakura, Hiroomi Torii, Kentaro Noi, Hirotugu Ogi, Ryo Iwamoto, Eisuke Mekada, Seiji Takashima, Yasushi Sakata,
RNA Aptamer Binds Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor with High Affinity and Specificity and Neutralizes Its Activity
International Journal of Gerontology, 2017 inpress

〔学会発表〕(計 4 件)

松崎高志、土田翔太、富海英、奥田啓二、山戸昌樹、荒木亮、南野哲男
HB-EGF 抗体を用いた動脈硬化巣への核酸デリバリーシステムの開発
第 32 回日本 DDS 学会学術集会, 2016 年 06 月 30 日~2016 年 07 月 01 日, グランシップ(静岡県コンベンションアーツセンター)

奥田啓二、松崎高志、富海英、土田翔太、荒木亮、山戸昌樹、福田達也、浅井智浩、奥直人、南野哲男
リボソーム化免疫抑制剤による心筋炎治療
第 32 回日本 DDS 学会学術集会, 2016 年 06 月 30 日~2016 年 07 月 01 日, グランシップ(静岡県コンベンションアーツセンター)

南野哲男、松崎高志、中谷大作、荒木亮
ドラッグデリバリーシステムを用いた急性心筋梗塞治療薬の開発
日本薬剤学会第 31 年会(招待講演)(国際学会), 2016 年 05 月 19 日~ 2016 年 05 月 21 日, 長良川国際会議場

南野哲男、松崎高志、中谷大作、荒木亮
DDS を用いた急性心筋梗塞治療薬の開発
第 32 回日本 DDS 学会学術集会(招待講演), 2016 年 06 月 30 日~2016 年 07 月 01 日, グランシップ(静岡県コンベンションアーツセンター)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 高志 (MATSUZAKI, Takashi)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助
教
研究者番号：90456939

(2) 研究分担者

眞鍋 史乃 (MANABE, Shino)
国立研究開発法人理化学研究所・主任研
究員研究室・専任研究員
研究者番号：60300901

(3) 研究分担者

富 海英 (FU, HaiYing)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助
教
研究者番号：70754646